

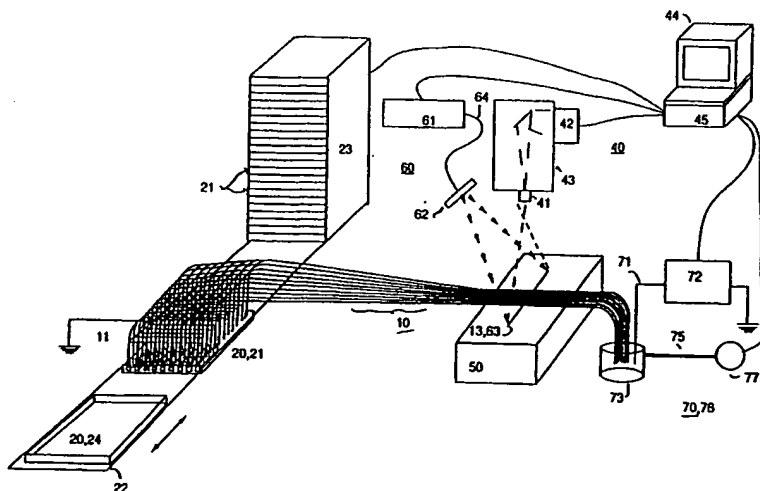
PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 27/447	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/39191 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. August 1999 (05.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00587 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Januar 1999 (29.01.99) (30) Prioritätsdaten: 198 03 753.8 30. Januar 1998 (30.01.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HELLER, Christoph [DE/DE]; Schlangenhader Strasse 34, D-14197 Berlin (DE). EICKHOFF, Holger [DE/DE]; Flanaganstrasse 41, D-14195 Berlin (DE). BEHR, Sven [DE/DE]; Ernst-Bruch-Zeile 22, D-13591 Berlin (DE). (74) Anwalt: HERTZ, Oliver ; v. Bezold & Sozien, Briener Strasse 52, D-80333 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	

(54) Title: **DEVICE AND METHOD FOR CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

(54) Bezeichnung: **VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR KAPILLARELEKTROPHORESE**



(57) Abstract

The invention relates to an electrophoresis device comprising a plurality of capillary columns (10) each having a detection area (10a), and a detection device (40) having an imaging device (41) and a detecting camera (42). The capillary columns are mounted on a shared fixing device (50) in such a way that the detection areas (10a) form a straight row (13) which is imaged on the detecting camera by means of the imaging device.

(57) Zusammenfassung

Eine Elektrophoreseeinrichtung enthält eine Vielzahl von Trennkapillaren (10), die jeweils einen Detektionsbereich (10a) aufweisen, und eine Detektoreinrichtung (40) mit einer Abbildungseinrichtung (41) und einer Detektorkamera (42), wobei die Trennkapillaren so an einer gemeinsamen Halterungseinrichtung (50) angebracht sind, daß die Detektionsbereiche (10a) eine gerade Reihe (13) bilden, die mit der Abbildungseinrichtung auf die Detektorkamera abgebildet wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Vorrichtung und Verfahren zur Kapillarelektrophorese

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Kapillarelektrophorese mit einer Vielzahl von Trennkapillaren und einem optischen Detektionssystem und ein Verfahren zur Verwendung einer derartigen Vorrichtung.

Die elektrophoretische Trennung von Substanzen und Substanzgemischen ist ein analytisches Verfahren, das insbesondere in der Biochemie und Molekularbiologie weit verbreitet ist. Die zu trennenden Substanzen werden unter Wirkung eines elektrischen Feldes in einem Trennmedium getrennt und separat detektiert. Bei der Kapillarelektrophorese befindet sich das Trennmedium in einer Kapillare (Innendurchmesser typischerweise $< 150 \mu\text{m}$). Der Trennvorgang erfolgt in der Kapillare; die Detektion kann sowohl im Inneren als auch am Ende der Kapillare erfolgen. Dies ist insbesondere hinsichtlich der Geschwindigkeit, des Auflösungsvermögens und der Minimierung der Probenmenge vorteilhaft. Zur Analyse komplexer biochemischer Reaktionen oder molekularbiologischer Vorgänge (z.B. zur Analyse komplexer Genome oder Proteinen) ist es erforderlich, eine äußerst große Anzahl verschiedener Proben (z.B. 10^5 bis 10^7) zu analysieren.

Es besteht daher ein Interesse an Einrichtungen zur multiplen Kapillarelektrophorese mit hohem Probendurchsatz und hochgradig parallel ablaufenden Analysen. Hierzu sind die im folgenden beispielhaft genannten Vielkanal- oder Multiplex-Anordnungen bekannt, die zwar eine hochparallele Verarbeitung erlauben, in der Regel jedoch so kompliziert aufgebaut sind, daß

ein Einsatz im Routinebetrieb nur beschränkt möglich ist. So wird in US-A-5 498 324 ein Multiplex-Fluoreszenzdetektorsystem für die Kapillarelektrophorese beschrieben, bei dem die Kapillaren jeweils mit optischen Fasern verbunden sind, über die das Anregungslicht separat in die Kapillaren geführt wird. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt durch ein Mikroskop mit einer CCD-Kamera. Dieser Aufbau ist wegen der Ankopplung optischer Fasern an die Kapillaren kompliziert und störanfällig. Die einkoppelbare Lichtmenge ist beschränkt, so daß auch die Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion begrenzt ist. Das System ist für den Routinebetrieb ungeeignet, da vor allem der Wartungsaufwand für die Kapillaranordnung (schwieriger Austausch von Kapillaren) mit den optischen Fasern erheblich ist.

Aus US-A-5 582 705 ist ein Multiplex-Kapillarelektrophorese-system bekannt, bei dem ein CCD-Detektor derart mit den Kapillaren optisch verbunden ist, daß das Innere einer Kapillare jeweils auf einen Pixel des CCD-Detektors abgebildet wird. Dieses System ist nachteilig, da die Detektoranordnung ein kompliziert aufgebautes, hochspezialisiertes System darstellt, das den Einsatz speziell angepaßter optischer Komponenten erfordert und somit nur beschränkt kompatibel mit bestehenden Laborsystemen zur Fluoreszenzdetektion ist. Außerdem besteht eine erhöhte Gefahr des "Übersprechens" von einer Kapillare zur anderen, falls die Konzentrationsunterschiede der Analyten sehr groß sind.

In US-A-5 584 982 und US-A-5 567 294 werden Mehrkapillarsysteme mit einer sogenannten "Sheath Flow"-Küvette beschrieben, mit der zwar eine Steigerung der Detektionsempfindlichkeit erzielt wird, die jedoch in nachteiliger Weise einen komplizierten Aufbau ohne die für den Routine-Laborbetrieb erforderliche Robustheit darstellt. Insbesondere ist bei einer solchen Küvette der Einsatz von ersetzbaren Trennmedien schwierig. Beim Ersetzen des Mediums kann die Küvette verunreinigt werden und

es besteht die Gefahr, daß während der Trennung das Trennmedium langsam ausfließt.

Schließlich ist aus US-A-5 675 155 ein Raster- oder Scanning-System bekannt, bei dem die Fluoreszenzsignale einer koplanar angeordneten Kapillargruppe mit einem Scanner-Detektor erfaßt werden. Bei diesem Detektor wird das Anregungs- bzw. Meßlicht mit einem beweglichen Spiegel aufeinanderfolgend auf die einzelnen Trennkapillaren gerichtet. Dieser Aufbau ist wegen der Störanfälligkeit durch den Einsatz beweglicher Teile und durch die begrenzte Auslesegeschwindigkeit nachteilig. Bei einer Kapillarelektrophorese ist es möglich, daß die getrennt zu detektierenden Proben so schnell laufen, daß eine zuverlässige Erfassung während eines Rasterdurchlaufs nicht möglich ist. Insbesondere die Kapillaren am Rand des Kapillarbündels werden nicht in gleichmäßigen Zeitabständen abgescannt. Schließlich sind die Scanning-Systeme für Routineanwendungen nicht genügend robust aufgebaut.

Bei der multiplen Kapillarelektrophorese besteht nicht nur ein Interesse an Stabilität und Parallelität der Verarbeitung sondern auch an einer Automatisierbarkeit des Gesamtanalyseablaufs beginnend bei der Beschickung eines Vorsatzreservoirs über die eigentlichen Trennvorgänge bis hin zur Reinigung der Trennkapillaren. Die Automatisierung von Kapillartrennanordnungen ist bisher aufgrund der genannten Nachteile bei Mehrkapillar-Systemen nicht erreicht worden, sondern nur für Einzelkapillar-Systeme realisiert.

Es ist die Aufgabe der Erfindung eine verbesserte Vorrichtung zur Kapillarelektrophorese anzugeben, die sich durch einen vereinfachten, stabilen Aufbau auszeichnet und eine Automatisierbarkeit der parallelen Trennung einer Vielzahl von Proben ermöglicht. Die Aufgabe der Erfindung ist es ferner, Verfah-

rensweisen zur Verwendung einer derartigen Vorrichtung anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch eine Elektrophoreseeinrichtung mit den Merkmalen gemäß Patentanspruch 1 bzw. ein Verfahren mit den Merkmalen gemäß Patentanspruch 17 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Erfindung basiert auf der Idee, eine Vielzahl von Trennkapillaren, die jeweils einen Detektionsbereich aufweisen, so anzuordnen, daß die Proben in allen Detektionsbereichen einer simultanen und gleichmäßigen Beleuchtung oder Anregung ausgesetzt sind und eine Detektoreinrichtung gleichzeitig die Abbildungen aller Detektionsbereiche erfaßt. Hierzu werden vorzugsweise bei einer gattungsgemäßen Mehrkapillartrenneinrichtung mit einem Vorratsreservoir mit einer Vielzahl von Proben, einer entsprechenden Vielzahl von Trennkapillaren (jeweils mit einem Detektionsbereich), die an einer gemeinsamen Halterungseinrichtung angebracht sind, einer Sammeleinrichtung und einem Meßsystem mit einer Beleuchtungseinrichtung und einer Detektoreinrichtung die folgenden Maßnahmen (einzeln oder gemeinsam) realisiert.

Die Halterungseinrichtung stellt für die Trennkapillaren einen Träger dar, auf dem die Trennkapillaren so ausgerichtet sind, daß die Detektionsbereiche eine gerade Reihe bilden. Die Detektionsbereiche sind beispielsweise Detektionsfenster an jeder der im übrigen mit Schutz- oder Abschirmschichten versehenen Trennkapillaren. Die Halterung kann außerdem eine "optische Isolierung" zwischen den Kapillaren bieten, wodurch ein "Übersprechen" ("crosstalk") zwischen den Kapillaren vermieden wird. Zusätzlich ist die Halterung modular aufgebaut (z.B. 6 Halter für je 16 Kapillaren), d.h. sie ermöglicht das Auswechseln kleinerer Kapillarbündel, ohne die Gesamtanordnung zerlegen zu müssen. Die Beleuchtungseinrichtung bildet vorzugsweise

ein strichförmiges, gleichmäßiges Beleuchtungsfeld, dessen Form an die Reihe der Detektionsbereiche angepaßt ist. Es ist ein besonderer Vorteil der Erfindung, daß die Beleuchtung oder Anregung der Proben in den Kapillaren unmittelbar durch Beleuchtung der Kapillarwand im Bereich des jeweiligen Detektionsbereiches von außen erfolgt. Es sind keine zusätzlichen Einkoppeleinrichtungen erforderlich und die Justierung wird durch die positionsfeste, jedoch lösbare Anbringung auf der Halterungseinrichtung realisiert.

Die Detektoreinrichtung basiert auf der Detektion des in den Detektionsbereichen durch die Kapillarwand nach außen tretenden Lichts. Mit einer geeigneten Abbildungseinrichtung werden sämtliche Detektionsbereiche simultan auf eine Detektorkamera abgebildet. Je nach den Analyseanforderungen umfaßt die Detektoreinrichtung eine Abbildung auf eine einzelne Detektorreihe oder auf eine Vielzahl von Detektorreihen, die eine zweidimensionale Matrix aus Detektorelementen bilden. Im letzteren Fall kann in der Detektoreinrichtung mindestens ein Dispersionselement vorgesehen sein, das zusätzlich zur simultanen Erfassung der Detektorbereiche eine Analyse der spektralen Eigenschaften des von den Detektionsbereichen ausgehenden Lichtes erlaubt.

Die Trennkapillaren münden in eine gemeinsame Sammeleinrichtung, die eine Doppelfunktion erfüllt. Erstens enthält die Sammeleinrichtung das Trägermedium zur Beschickung der Trennkapillaren. Zweitens werden die getrennten Substanzen an der Sammeleinrichtung gemeinsam aufgenommen. Hierzu enthält die Sammeleinrichtung vorzugsweise eine Auffangvorrichtung für die Moleküle der zu trennenden Proben. Diese Auffangvorrichtung (oder "Molekülfalle") ist ein halbdurchlässiges Wandelement, das die Enden der Trennkapillaren von der Hochspannungsversorgung zur Erzeugung der Molekülbewegungen in den Trennkapillaren separiert.

Während der elektrophoretischen Trennung werden die Moleküle durch das poröse Wandelement zur Elektrode gezogen und sammeln sich somit in der Molekülfalle an. Die passive Rück-Diffusion durch das Wandelement ist stark behindert, da die Poren sehr klein sind. Nach Beendigung der Analyse wird ein Druck von bis zu 5 bar an die Sammeleinrichtung (Vorratsgefäß) gelegt, jedoch in den Bereich außerhalb der Molekülfalle. Dadurch wird verhindert, daß bereits analysierte Moleküle in die Kapillaren zurückgedrückt werden und die nachfolgenden Trennungen stören.

Ein wichtiges Merkmal der erfindungsgemäßen Verfahrensweise besteht darin, daß sowohl die Beleuchtung bzw. Anregung der zu trennenden Proben in den Detektionsbereichen als auch die Detektion des von den Proben ausgehenden Lichts durch die Kapillarwand von außen in das Kapillarinne bzw. umgekehrt erfolgt. Zur Verringerung von Hintergrundsignalen werden hierzu vorzugsweise dünnwandige Kapillaren mit einer Wanddicke von rd. 35 bis 50 μm eingesetzt. Es sind jedoch auch größere Bauformen (dickwandigere Kapillaren) möglich. Weiterhin sind andere Formen des Detektionsbereichs möglich, z.B. durch Einkoppeln der Kapillaren in eine Küvette oder in eine Mikrostruktur mit Kanälen. Der Aufbau der Detektionseinheit mittels Linsen und Objektiven erlaubt eine einfache Änderung des Abbildungsmaßstabes (zur optimalen Abbildung des Detektionsbereichs auf die Detektorelemente) und damit eine größere Flexibilität bezüglich der Bauform des Detektionsbereiches. Der Betrieb der Trenneinrichtung gemäß der Erfindung erfolgt vorzugsweise mit einem niedrigviskosen Trennmedium. Damit wird der an der Sammeleinrichtung (oder dem Auslaßgefäß) aufzubringende Beschickungsdruck verringert und die Beschickungsgeschwindigkeit erhöht. Das einfache Ersetzen des Trennmediums erlaubt ein ausreichendes Spülen der Kapillaren (entweder mit dem Trennmedium selbst oder zuvor mit einem Reinigungsmittel) und erhöht dadurch die Lebensdauer der Kapillaren.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Die Trenneinrichtung besitzt einen kompakten Aufbau ohne bewegliche Teile. Die Beleuchtung und die Detektion sind kompatibel mit verfügbaren Laboraufbauten und mit derzeit verwendeten Farbstoffmarkierungen. Dies bedeutet Vorteile einerseits beim Routinebetrieb durch nicht hochspeziell geschultes Personal und andererseits bei der Wartung. Die Erfindung ermöglicht erstmalig einen vollständig automatisierbaren Analysevorgang, dessen Einzelheiten unten erläutert werden. Es können beispielsweise rd. 15000 verschiedene Proben analysiert werden, bevor erstmals ein Eingriff durch einen Bediener erforderlich wird. Das System besitzt einen hohen Multiplexgrad. Sowohl die Probenzufuhr (vorzugsweise mit gängigen Formaten, z.B. aus Mikrotiterplatten) als auch die Beleuchtung und Detektion erfolgt in allen Kanälen, die jeweils durch eine Trennkapillare gebildet werden, gleichzeitig. Spezielle Detektionsaufbauten, wie z.B. eine "Sheath-Flow"-Küvette sind nicht erforderlich. Die Halterungseinrichtung für die Trennkapillaren ist robust aufgebaut, verhindert eine Streustrahlung zwischen den Kapillaren und erlaubt zur Vereinfachung der Wartung eine bündelweise Anbringung der Kapillaren. Der Beschickungsdruck des Trägermediums kann von rd. 70 bar bei herkömmlichen Trägermedien (z.B. 2% Hydroxyethylcellulose, Viskosität: rd. 1000 centiStokes) auf rd. 5 bar gesenkt werden, falls Trägermedien mit Viskositäten von 100 centiStokes (beispielsweise 10-15% Dextran oder 4-8% Polydimethylacrylamid) verwendet werden.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1: eine schematische Übersichtsdarstellung des Aufbaus einer Elektrophoreseeinrichtung gemäß der Erfindung;

- Fig. 2: eine Teilansicht einer Halterungseinrichtung, die Teil einer Trenneinrichtung gemäß Fig. 1 ist;
- Fig. 3: eine Übersichtsdarstellung zur Illustration der spektral aufgelösten Detektion gemäß der Erfindung;
- Fig. 4: eine weitere Übersichtsdarstellung zur Illustration der spektral aufgelösten Detektion gemäß der Erfindung;
- Fig. 5: eine Illustration der Erfassung von Detektorsignalen;
- Fig. 6: eine schematische Seitenansicht einer Sammeleinrichtung, die Teil einer Trenneinrichtung gemäß Fig. 1 ist;
- Fig. 7: eine spezielle Kapillarform, die zur elektrophoretischen Trennung gemäß der Erfindung verwendet wird, wobei die Kapillare am Ende metallisch beschichtet ist und gleichzeitig als Elektrode dient;
- Fig. 8: eine Kurvendarstellung zur Illustration der gleichmäßigen Ausleuchtung durch den Liniengenerator;
- Fig. 9: eine Kurvendarstellung zur Illustration von Detektorsignalen von drei zueinander benachbarten Trennkapillaren;
- Fig. 10: Kurvendarstellungen zur Illustration der Konzentrationsabhängigkeit der Trennmedienviskosität; und
- Fig. 11: Kurvendarstellungen zur Illustration von experimentellen Ergebnissen mit einer Trenneinrichtung gemäß der Erfindung.

Die Erfindung wird im folgenden unter Bezug auf eine bevorzugte Ausführungsform beschrieben, bei der eine elektrophoretische Trennung von in Mikrotiterplatten gelagerten Proben durch Erfassung der Wanderung von Probenbestandteilen durch Trennkapillaren mit einem Trägermedium unter Wirkung einer Hochspannung erfolgt. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die Ausrichtung der Kapillareintrittsenden in Bezug auf eine Mikrotiterplatte oder bestimmte Trennmedien oder eine bestimmte Trennwirkung beschränkt, sondern vielmehr in allen Elektrophoresekapillarsystemen mit einer Vielzahl von Trennkapillaren realisierbar.

Fig. 1 zeigt eine Elektrophoreseeinrichtung gemäß der Erfindung, bei der eine Vielzahl von Trennkapillaren 10 auf einer gemeinsamen Halterungseinrichtung 50 angebracht sind, deren Einzelheiten unten unter Bezug auf Fig. 2 erläutert werden. Die Trennkapillaren 10 sind so ausgerichtet, daß Detektionsbereiche beispielsweise in Form von Detektionsfenstern eine gerade Reihe 13 bilden. Eine Beleuchtungseinrichtung 60 mit einer Lichtquelle 61 und einer Abbildungsoptik 62 bildet ein strichförmiges Beleuchtungsfeld 63, das mit der Reihe 13 der Detektionsfenster der Kapillare 10 zusammenfällt. Es ist ferner eine Detektoreinrichtung 40 vorgesehen, die eine Abbildungseinrichtung 41, eine Detektorkamera 42 und ein Dispersionselement 43 enthält. Das Dispersionselement 43 ist eine fakultative Baugruppe, auf die bei bestimmten Anwendungen verzichtet werden kann, wie unten erläutert wird. Die Detektorkamera 42 ist mit einer Steuer- und Datenspeichereinrichtung 44, beispielsweise in Form eines Computers und einer Steuerelektronik 45 verbunden.

Die Trennkapillaren 10 führen von einem Einlaßreservoir 20 (Proben (21)- oder Vorrats (24)-Reservoir) zu einer Sammeleinrichtung 70. Die elektrophoretischen Trennstrecken werden gebildet, indem über Elektroden 11 bzw. 71 zwischen das Einlaß-

reservoir 20 und die Sammeleinrichtung 70 eine Hochspannung angelegt wird. Hierzu wird beispielsweise das Einlaßreservoir 20 mit Massepotential und die Sammeleinrichtung 70 mit einer Hochspannungsversorgungseinrichtung 72 verbunden. Diese Hochspannungsversorgungseinrichtung kann Gleichspannung oder - für spezielle Zwecke - eine modulierte Spannung (z.B. Pulse, Sinusform etc.) liefern und wird über die Einheit 44, 45 gesteuert. Das Einlaßreservoir 20 ist ein Probenreservoir 21 (während der Injektion) oder ein Vorratsreservoir 24 (während der Trennung).

Das Probenreservoir 21 ist vorzugsweise ein ebenes Substrat mit einer Vielzahl von in vorbestimmter Weise angeordneten Proben, die parallel (oder simultan) der elektrophoretischen Trennung unterzogen werden sollen. Dieses Substrat ist vorzugsweise eine Mikrotiterplatte mit einem üblichen Format (beispielsweise 96-Loch-, 384-Loch- oder 1536-Loch-Platte). Zur durchgängigen Automatisierung der Trennung beginnend mit der Probenzufuhr ist das Probenreservoir auf einer Transportvorrichtung 22 angeordnet, mit der in Abhängigkeit von vorbestimmten Steuersignalen aus der Einheit 44, 45 ein gewünschtes Probenreservoir 21 aus einer Lagereinrichtung 23 in die Betriebsposition an den Einlaßenden der Trennkapillaren bewegt werden kann. Hierzu sind die Transporteinrichtung 22 und/oder Lagereinrichtung 23 mit entsprechenden Stellmitteln und Positionsgebern ausgerüstet. Die Transporteinrichtung 22 ist ferner dazu vorgesehen, nach Beschickung der Einlaßenden der Trennkapillaren das Probenreservoir 21 durch ein Vorratsreservoir 24 zu ersetzen, so daß der Stromkreis erneut geschlossen wird.

Die Einlaßenden 11 der Trennkapillaren 10 sind so ausgerichtet, daß sie den Positionen der zu trennenden Proben auf dem Substrat bzw. dem Probenreservoir 21 entsprechen. Die Trennkapillaren 10 besitzen beispielsweise einen Außendurchmesser von

100 μm bis 400 μm . Bevorzugte Bauformen sind Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 375 μm und einem Innendurchmesser von 100 μm , sowie Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 200 μm und einem Innendurchmesser im Bereich von 50 bis 100 μm oder Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 150 μm und einem Innendurchmesser von 75 μm . Die Kapillarwanddicke kann jedoch auch jeden anderen Wert einnehmen, der eine reproduzierbare Detektion mit den unten beschriebenen Beleuchtungs- und Detektionseinrichtungen erlaubt. Die Gesamtlänge der Trennkapillaren beträgt bei der dargestellten Ausführungsform rd. 40 bis 50 cm, wobei die Länge jedoch anwendungsabhängig modifiziert werden kann.

Die Trennkapillaren bilden eingangsseitig im wesentlichen einen ebenen 2-dimensionalen ("bürstenartigen") Fächer, dessen Dimensionen etwa denen des Probenreservoirs 21 entspricht. Zu der Halterungseinrichtung 50 hin werden die Trennkapillaren derart zusammengeführt, daß sie zumindest auf der Länge, in der die jeweiligen Detektionsbereiche als Reihe 13 angeordnet sind, dicht beieinanderliegen (s. Fig. 2).

In dem Bereich, in dem die Trennkapillaren vor der Halterungseinrichtung 50 zusammengeführt werden, kann eine Temperierungseinrichtung vorgesehen sein. Die Temperierungseinrichtung ist beispielsweise zum Umströmen der Trennkapillaren mit einem temperierten Medium (z.B. Luft) ausgelegt und dazu eingerichtet, die Trennkapillaren zu thermostatisieren. Es wird vorzugsweise eine Temperatur im Bereich von 10°C bis 60°C eingestellt.

Die Beleuchtungseinrichtung 60 ist dazu vorgesehen, die Reihe der Detektionsbereiche der Trennkapillaren auf der Halterungseinrichtung 50 möglichst gleichmäßig zu beleuchten, so daß die Probenbestandteile, die beim Trennvorgang die Detektionsbereiche passieren, jeweils im wesentlichen denselben Lichtmengen

ausgesetzt sind. Da sich die Reihe 13 der Detektionsbereiche beispielsweise über eine Breite der Kapillargruppe von rd. 5 cm erstreckt, wird zur Erzielung einer genügenden Beleuchtungs- oder Anregungsintensität vorzugsweise eine Laser-Lichtquelle 61 mit einer Optik 62 kombiniert, die ein strichförmiges Beleuchtungsfeld bildet (sogenannter "Line-Generator"). Der Laser 61 ist in Abhängigkeit von den Spektraleigenschaften der verwendeten Fluoreszenzmarkierung ausgewählt (beispielsweise: Ar-Laser mit einer Leistung von rd. 50 bis 200 mW) und kann ebenfalls über die Steuereinheit 44, 45 angesteuert werden.

Die Optik 62 bildet das strichförmige Beleuchtungsfeld. Die Optik kann beispielsweise durch einen mit hoher Geschwindigkeit schwingenden oder rotierenden Spiegel gebildet werden, was jedoch gegebenenfalls nachteilig für die Stabilität der Anordnung ist. Es ist auch der Einsatz einer Zylinderlinse möglich, die vorteilhafterweise bewegliche Teile vermeidet, jedoch so bemessen sein muß, daß trotz der Gauß-verteilten Intensität des Beleuchtungsfelds eine Zylinderlinse eine genügend homogene Bestrahlung der Kapillarreihe ermöglichen wird. Die Optik 62 wird daher gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung mit einer sogenannten Powell-Linse (Hersteller: OZ Optics, Kanada) realisiert, die eine homogene Ausleuchtung und optimale Ausnutzung der Laserleistung ermöglicht (s. Fig. 8). Die Powell-Linse kann ferner direkt über eine Lichtleitfaser 63 mit dem Laser 61 verbunden werden, wodurch ein robuster und transportabler Aufbau erzielt wird, in dem keine beweglichen Teile wie Drehspiegel oder dgl. enthalten sind und der sicherstellt, daß abgesehen von dem strichförmigen Beleuchtungsfeld kein kohärentes oder hochfokussiertes Licht austritt (Benutzersicherheit).

Die Lichtleitfaser 64 erlaubt zudem ein leichtes Auswechseln des Lasers (z.B. zur Anpassung an andere Fluoreszenzmarkierung-

gen) oder - in Kombination mit speziellen Kopplern - die Durchleitung des Lichts zweier verschiedener Laser auf das gleiche Beleuchtungsfeld.

Die Lichtintensität des Beleuchtungsfeldes der Powell-Linse ist in Richtung der Linienerstreckung gleichmäßig verteilt und senkrecht dazu (d.h. in einer Richtung parallel zur Ausrichtung der Trennkapillaren) Gauß-verteilt. Die Parameter der Powell-Linse und der Anordnung in Bezug auf die Detektorfenster werden so gewählt, daß eine Strichfokussierung auf eine Strichbreite von rd. 1 mm oder weniger erfolgt. Je schmaler das Beleuchtungsfeld ist, desto höher ist die erzielbare Auflösung der Trennvorrichtung.

Einzelheiten der Detektionseinrichtung 40 und der Sammeleinrichtung 70 werden unten unter Bezug auf die Fign. 3, 4 und 5 erläutert.

Fig. 2 zeigt einen Ausschnitt einer Halterungseinrichtung 50 als schematische Perspektivansicht zur Illustration der ebenen, parallelen Anbringung der Trennkapillaren auf der Oberseite der Halterungseinrichtung (unterer Teil von Fig. 2) und eine vergrößerte Perspektivansicht mit einem Kapillarabschnitt in Phantomansicht (oberer Teil von Fig. 2). Die Halterungseinrichtung umfaßt mindestens den dargestellten Kapillarhalter 51, der den Trennkapillaren 10 mechanische Unterstützung in der Fokusebene der Beleuchtungseinrichtung gibt und eine optische Isolierung zwischen den Trennkapillaren sicherstellt. Es können mehrere Kapillarhalter für je beispielsweise 16 Kapillaren vorgesehen sein, wobei die Gesamthalterung 50 dann modulweise aufgebaut ist und einzelne Kapillarhalter als Module austauschbar sind. Die Trennkapillaren sind außer in den Detektionsbereichen mit Schutzschichten versehen, die gegebenenfalls lichtundurchlässig sind. In den Detektionsbereichen 10a sind die Trennkapillaren beschichtungsfrei. Der Kapillarhalter

51 unterstützt die Trennkapillaren mindestens in einem Längenabschnitt, in dem sich die Detektionsbereiche befinden. In bezug auf die Gesamtlänge der Trennkapillaren ist dies vom Einlaßende her gesehen im hinteren Viertel oder hinteren Drittel der Länge der Trennkapillaren. So bilden die Detektionsbereiche oder Detektionsfenster der Trennkapillaren bei einer Trennkapillarenlänge von rd. 50 cm eine gerade Reihe, die von den Auslaßenden der Kapillaren einen senkrechten Abstand von rd. 5 bis 20 cm, vorzugsweise 10 cm, besitzt. Generell besteht zur Erhöhung des Auflösungsvermögens ein Interesse daran, die Detektionsfenster möglichst weit stromabwärts in bezug auf die Wanderungsrichtung der zu trennenden Proben anzubringen.

Der Kapillarhalter ist ein Block mit Führungsnuten 52, in die die Trennkapillaren eingelegt sind. Die Trennwände 53 dienen der optischen Trennung zwischen den Detektionsbereichen der einzelnen Trennkapillaren. Die Trennwände werden durch möglichst dünne Stege 53 gebildet, um so eine enge Packung der Kapillaren zu ermöglichen und die Bildung von Schatten des in Betriebsposition von oben aufgestrahlten Beleuchtungs- oder Anregungslichtes zu vermeiden. Ersatzweise ist es auch möglich, den Kapillarhalter 51 ohne Nuten auszuführen und die Kapillaren aneinandergrenzend flach auf die Oberseite des Kapillarhalters aufzulegen. Dies erfordert jedoch, daß anstelle der Trennwände 53 als optische Isolierungseinrichtungen auch in den Detektionsbereichen lichtundurchlässige Beschichtungen auf den jeweils zu benachbarten Trennkapillaren weisenden Seiten der Trennkapillaren vorgesehen sind, oder eine exakte optische Abbildung.

An der Halterungseinrichtung sind ferner nicht dargestellte Befestigungsmittel (beispielsweise Klemmen) zur lösbaren Befestigung der Trennkapillaren 10 in den Nuten 52 vorgesehen. Es kann vorgesehen sein, daß die Halterungseinrichtung die Trennkapillaren auch in Längenabschnitten außerhalb der Detektions-

bereiche unterstützt. In der Regel ist es jedoch ausreichend, daß die Trennkapillare vom Einlaßreservoir 20 zur Halterungseinrichtung 50 (s. Fig. 1) durch Luft geführt werden. Es können aber auch Temperiereinrichtungen in diesem Abschnitt vorgesehen sein, um den Trennvorgang unter vorbestimmten Temperaturbedingungen ablaufen zu lassen.

Im folgenden wird unter Bezug auf die Fign. 3 und 4 das Prinzip der spektral aufgelösten Multiplex-Detektion erläutert. Während es bei einfachen Analyseaufgaben, bei denen nur ein Fluoreszenzmarker erfaßt werden muß, ausreicht, an der Abbildungseinrichtung 41 der Detektoreinrichtung 40 (s. Fig. 1) geeignete Filter zur Abschirmung des Anregungslichts bei Fluoreszenzmessung anzubringen, ist bei komplizierteren Analyseaufgaben eine spektrale Trennung des von den Detektionsbereichen ausgehenden Lichtes erforderlich. Dies ist beispielsweise bei der DNA-Sequenzierung der Fall, wenn Nukleotide spezifisch mit Fluoreszenzmarkern versehen sind und dementsprechend selektiv beispielsweise als vier getrennte Fluoreszenzbanden detektiert werden sollen.

Die Erfindung liefert vorteilhafterweise simultan eine hervorragende Spektral- und Ortsauflösung, indem eine Abbildung der Detektionsfensterreihe auf eine zweidimensionale Detektormatrix mit Spektral- und Ortsauflösung entsprechend den zwei Matrixdimensionen abgebildet wird. Dies ist schematisch in Fig. 3 dargestellt. Die abweichend von der Betriebsposition vertikal dargestellte Anordnung von Trennkapillaren 10 mit der Detektionsfensterreihe 13 wird mit einer Abbildungseinrichtung (nicht dargestellt) und dem Dispersionselement 43 auf eine CCD-Matrix 42 abgebildet. Das Dispersionselement 43 ist symbolisch durch ein Prisma dargestellt, kann jedoch durch jeden wellenlängendispersiven Aufbau mit hoher Ortsauflösung gebildet werden. Die Abbildung auf der CCD-Matrix erfolgt derart, daß in y-Richtung die Ortsauflösung und in x-Richtung die

Spektralauf­lö­sun­g rea­li­siert wird. Die Ma­tri­x ent­hält so­mit be­leuch­te­te Pixel­rei­hen, de­ren Zahl der Zahl der Trenn­ka­pi­lla­ren ent­spricht. Je­des Pixel lie­fert ein De­tek­to­r­si­gnal in Ab­hän­gig­keit von der ein­ge­fal­le­nen Licht­men­ge, so daß der De­tek­to­r­si­gnal­ver­lauf je­der x-Rei­he dem Spek­tral­ver­lauf des von ei­ner Trenn­ka­pi­lla­re aus­ge­hen­den Lichtes ent­spricht. Es kann vor­ge­se­hen sein, daß je nach dem ein­ge­setz­ten Fluoreszenz­farb­stoff oder -mar­ker nur ein Teil­be­reich ei­ner oder mehr­ere x-Rei­hen aus­ge­le­sen wird, der ge­ra­de dem er­war­te­ten Wellen­län­gen­emissions­be­reich des Fluoreszenz­farb­stoffs oder -mar­kers ent­spricht. Die spek­tra­le Auf­lö­sun­g ist zur Messung in min­de­stens drei Spek­tral­be­rei­chen aus­ge­legt.

Ein­zel­hei­ten der spek­tral- und orts­auf­ge­lö­sten De­tek­tion sind in Fig. 4 ge­zeigt. Ge­mäß ei­ner be­vor­zug­ten Aus­füh­rungs­form wird die De­tek­ti­ons­fen­ster­rei­he 13 mit ei­nem er­sten Ob­jek­tiv 411 auf ei­nen Spalt 412 ab­ge­bil­det. Ein zwei­tes, in­ver­tiertes Ob­jek­tiv 413 sen­det das Licht vom Spalt durch das Dis­per­si­on­sele­ment 43. Ein oder mehr­ere Filter 414 zur Aus­blen­dung des An­re­gungs­lichtes kön­nen sich ent­we­der vor dem Ob­jek­tiv 411 (wie dar­ge­stellt) oder zwi­schen dem in­ver­tierten Ob­jek­tiv 413 und dem Dis­per­si­on­sele­ment 43 be­fin­den. Das Dis­per­si­on­sele­ment 43 ist ent­we­der ein klas­si­sches Spek­tral­ge­rät mit Pri­smen und/oder Git­tern (Nach­teil: Än­de­rung der Ab­bil­dungs­rich­tung, ver­min­de­te ört­liche Auf­lö­sun­g) oder vor­zugs­wei­se durch ein Ge­ra­dsicht­pri­ma 431 (so­ge­nanntes Amici-Pri­ma, Fig. 4A) oder durch ei­ne Pri­ma-Git­ter-Pri­ma-Kom­bi­na­tion 432 (Fig. 4B) oder durch ei­ne L-för­mi­ge An­ord­nung mit ei­nem ho­lo­graphi­schen Trans­mis­si­ons­git­ter 433 (Fig. 4C) ge­bil­det. Beim letz­ten­ge­nannten Bei­spiel ge­mäß Fig. 4C wird das Licht in ei­nem be­stimm­ten Win­kel über ei­nen Spiegel 434 auf das Trans­mis­si­ons­git­ter 433 ein­ge­strahlt. Das Ge­ra­dsicht­pri­ma 431 oder die Kom­bi­na­tion 432 oder der L-för­mi­ge Auf­bau mit dem Trans­mis­si­ons­git­ter 433 be­sitzen den Vor­teil ei­nes kom­pak­ten Auf­baus und ei­ner er­höhten Ro­bus­theit. Stö­run­gen durch Ab­er­ra­tionen und Astig­ma­tis­mus

sind weitgehend ausgeschlossen. Ferner wird ein hoher Lichtdurchsatz bei gleichzeitig geringer Fokusslänge gewährleistet. Bei den ersten beiden Gestaltungen bleibt eine gerade optische Achse von den Detektionsfenstern zur Detektorkamera erhalten. Bei dieser Gestaltung kann der gesamte Aufbau aus Objektiven, Spalt, Filter und Dispersionselement in einem gegen Streulicht abgeschirmten Tubus angeordnet werden, der als "tragbares Spektrometer" sogar mobil gestaltet werden kann. Durch geeignete Wahl der Abbildungsparameter der Objektive und des Dispersionselements ist der Abbildungsmaßstab in weiten Bereichen wählbar, so daß sich eine hohe Flexibilität in bezug auf die Zahl und Durchmesser der Trennkapillaren ergibt.

Das durch das Dispersionselement 43 durchtretende Licht wird mit einem Objektiv 415 auf die Kamera 42 abgebildet. Der CCD-Chip 421 der Kamera 42 besitzt beispielsweise 500×500 Pixel, aus denen anwendungsabhängig (insbesondere in Abhängigkeit von der Zahl und Größe der zu erfassenden Trennkapillaren) Pixelgruppen ausgewählt werden, die beim Analysevorgang ausgelesen werden. Bei einer Pixelgröße von beispielsweise $24 \times 24 \mu\text{m}$ können geringste Dejustierungen (z.B. Verschiebungen der Trennkapillaren) eine Verschiebung der Abbildung auf der CCD-Matrix verursachen. Zur Vermeidung dieser Erscheinung wird erfindungsgemäß ein Suchalgorithmus durchgeführt, in dessen Ergebnis die genannten Pixelgruppen festgelegt werden, die ausgelesen werden sollen. Dies bedeutet, daß die Steuereinrichtung 44 automatisch die gewünschten Bildpunkte des spektral- und orts aufgelösten Bildes der Detektionsfensterreihe auswählt. Als Algorithmus für das Auslesen wird ein geeigneter Algorithmus aus der Bilddatenverarbeitung verwendet, so z.B. der sogenannte Wasserscheidenalgorithmus (s. S. Wegner et al. in "Spektrum der Wissenschaft", 1997, S. 113) oder der sogenannte Chain-Code-Algorithmus, der im folgenden unter Bezug auf Fig. 5 erläutert wird.

Bei Verwendung von beispielsweise 100 Kapillaren und n Fluoreszenzemissionen werden auf dem CCD-Chip $100 * n$ Pixelgruppen ("Regions of Interest") gebildet. Die Pixel der Gruppen müssen zusammengefaßt (sogenanntes "binning") und korreliert ausgelesen werden. Die Pixelgruppen werden in vorbestimmter Weise definiert oder mit dem Datenverarbeitungsalgorithmus in einer ersten Versuchsphase automatisch ermittelt. Beim Chain-Code (s. Fig. 5) wird nur ein Startpunkt der Matrixkoordinaten aufgezeichnet, und die übrigen, zu einer Gruppe gehörigen Pixel werden mit vorbestimmten RichtungsCodes erfaßt und ausgelesen. Es können beispielsweise wie dargestellt acht RichtungsCodes vorgesehen sein, die sich auf die acht Pixel beziehen, die ein betrachtetes Pixel umgeben. Durch Angabe einer Nummernfolge entsprechend den durchnumerierten Richtungen können alle zu einer Pixelgruppe gehörigen Pixel eindeutig angegeben werden. Diese Angabe ist gegenüber geringen Bildverschiebungen (Versetzung im linken Teil der Abbildung) unempfindlich und erlaubt in vorteilhafter Weise eine Verringerung des zur Charakterisierung einer Gruppe erforderlichen Speicherbedarfs.

Fig. 6 zeigt in schematischer Seitenansicht Einzelheiten der Sammeleinrichtung (oder des Auslaßgefäßes) 70 (s. Fig. 1). Die Sammeleinrichtung 70 besteht aus einem Druckgefäß 73 mit einem pH-gepufferten Trägermedium 74. Das Druckgefäß 73 ist über eine Druckleitung 75 mit einer Pumpeinrichtung 77 verbunden, die Druckluft zur Beschickung der mit den Auslaßenden in das Trägermedium ragenden Trennkapillaren 10 bereitstellt. Die Pumpeinrichtung wird über die Einheit 44, 45 gesteuert. In das Trägermedium ragt außerdem eine Elektrode 71, die mit einer (nicht dargestellten) Hochspannungsversorgungseinrichtung verbunden ist. Zwischen der Elektrode 71 und den Auslaßenden der Trennkapillaren 10 ist eine gestrichelt dargestellte Molekülfalle 76 vorgesehen, die zum Auffangen der getrennten Proben eingerichtet ist. Unter der Wirkung eines elektrischen Feldes treten die getrennten Proben aus den Kapillarenden aus und wan-

dern zur Elektrode 71. Dabei treffen sie auf die Molekülfalle in Form einer porösen Trennwand (z.B. eine Membran oder ein Gel) mit Poren einer charakteristischen Größe von rd. 10 bis 100 nm Durchmesser. Das Auffangen der getrennten Proben oder Moleküle wird nach einem der folgenden Prinzipien realisiert.

Da die Geschwindigkeit der Wanderung unter Wirkung eines elektrischen Feldes wesentlich höher als die Geschwindigkeit einer Diffusionswanderung ist, wird die Wahrscheinlichkeit für einen Durchtritt von Molekülen durch die Molekülfalle von der Elektrode zu den Auslaßenden während einer Abschaltzeit der Hochspannung sehr gering. In diesem Fall ist es nicht erforderlich, die Porengröße in besonders genau festgelegten Grenzen auszuwählen. Gemäß einem alternativen Mechanismus wird davon ausgegangen, daß die getrennten Proben aus feldabhängig gestreckten Molekülen (Polyelektrolyte) bestehen, die unter Wirkung des elektrischen Feldes in gestreckter Form relativ leicht die Poren passieren, nach Abschalten des Feldes in Kugelform jedoch nur schwer durch die Poren hindurchtreten können.

Gemäß einer bevorzugten Ausführung der Erfindung sind die Elektroden eingangsseitig unmittelbar an den Kapillaren angebracht, wie dies schematisch in Fig. 7 dargestellt ist. Hierzu tragen die Einlaßenden der Trennkapillaren eine äußere Metallbeschichtung 14 (beispielsweise aus Silber oder Platin), wodurch simultan die Elektrodenfunktion erfüllt wird. Dies erlaubt eine erhebliche Verringerung des minimalen Injektionsvolumens. Über eine Kontakteinrichtung (z.B. Klammer) 15 wird der elektrische Kontakt hergestellt.

Im folgenden wird der Ablauf einer Trennanalyse unter Verwendung der oben beschriebenen Trenneinrichtung (s. Fig. 1) beschrieben. Zuerst wird zur Trägermedienbeschickung eine leere Platte oder ein Gefäß unter die Einlaßenden der Trennkapilla-

ren gefahren und das Druckgefäß 73 der Sammeleinrichtung 70 mit einem Druck derart beaufschlagt, daß das Trägermedium 74 in die Auslaßenden der Trennkapillaren eintritt und durch diese bis an die Einlaßenden läuft. Der Druck wird abgesetzt, sobald genügend Trennmedium durch die Kapillaren geflossen ist. Bei einem sich anschließenden Vorlageschritt wird das Probenreservoir 21 von unten an die Einlaßenden der Trennkapillaren gefahren, so daß die Einlaßenden in die auf dem Vorratsreservoir angeordneten Probenmengen eintauchen. Anschließend wird zur Probenbeschickung für eine bestimmte Beschickungszeit eine Hochspannung an die Trennkapillaren gelegt, um in die Einlaßenden kleinste Probenmengen zu injizieren. Die Beschickungszeit und die Hochspannung werden derart ausgewählt, daß jeweils die ersten Millimeter der Trennkapillaren mit den zu trennenden Proben gefüllt sind. Dies wird beispielsweise bei den obengenannten Kapillaren mit Innendurchmessern im Bereich von 50 bis 100 µm bei Einsatz üblicher Lösungsmittel mit einer Beschickungszeit im Bereich von 1 bis 20 Sekunden und einer Hochspannung von ca. 100 V/cm - 400 V/cm (vorzugsweise rd. 10 kV) erreicht. Nach der Probenbeschickung wird das Probenreservoir 21 durch das Vorratsreservoir 24 mit einer Pufferlösung (Elektrolytlösung) ersetzt, mit der während des sich anschließenden Trennvorgangs die Einlaßenden der Trennkapillaren in Verbindung stehen. Für den eigentlichen Trennvorgang wird wieder die Hochspannung für eine anwendungsabhängig gewählte Trennzeit angelegt, die im Bereich von 10 bis 30 Minuten oder aber auch im Stundenbereich liegen kann.

Während des gesamten, mit der Steuereinrichtung 44 automatisch steuerbaren Trennvorganges wandern die zu trennenden Proben (Moleküle, DNA-Abschnitte, Proteine oder dgl.) hin zu den Auslaßenden der Trennkapillaren. Durch das Trennmedium erfolgt eine "Selektion", d.h. die kleinen Moleküle erreichen die jeweiligen Detektionsfester schneller als die großen Moleküle, so daß durch die orts- und spektralaufgelöste Detektion an

jedem einzelnen Sektionsfenster in Abhängigkeit von der Zeit eine vollständige Analyse der Probenzusammensetzung vorgenommen werden kann. Die Trennung der Moleküle kann auch durch andere Mechanismen erfolgen, z.B. durch sogenannte "endlabeled free solution electrophoresis".

Experimentelle Ergebnisse der erfindungsgemäßen Trenneinrichtung sind in den Fign. 8 bis 11 dargestellt. Fig. 8 zeigt einen Vergleich der Ausleuchtung des Detektionsbereichs mittels einer Zylinderlinse und mittels eines "Linien-Generators" (Das "verrauschte" Signal kommt hier durch die Verwendung einer "multimode"-Lichtfaser statt einer "monomode"-Lichtfaser zustande). Die Zylinderlinse erzeugt ein sog. Gauß-förmiges Profil, wogegen der line-generator ein plateauförmiges Profil, und damit eine homogenere Ausleuchtung erzeugt. Fig. 9 zeigt einen Kurvenverlauf zur Illustration des praktisch ausgeschlossenen Übersprechens ("Cross-Talk") zwischen verschiedenen Trennkanälen (Trennkapillaren). Die drei Maxima entsprechen den Detektorsignalen aus Pixelgruppen, die benachbarten Trennkapillaren zugeordnet sind. Das Übersprechen zwischen benachbarten Kapillaren ist geringer als 1%, so daß eine eindeutige und reproduzierbare Zuordnung der Detektorsignale zu den Trennkanälen möglich ist. Im gezeigten Beispiel waren die Kapillaren ohne Trennwand nebeneinander angeordnet. Durch die optische Trennung des Kapillarhalters wird das Übersprechen noch weit geringer.

Fig. 10 illustriert die erfindungsgemäße Wahl eines niedrigviskosen Trägermediums (Trennmatrix). Die Kurvenverläufe zeigen die Abhängigkeit der Trennmedien-Viskosität von der jeweiligen Trennmedien-Konzentration. Die Konzentration wird so ausgewählt, daß die Viskosität 100 centiStokes (mm^2/s) (entsprechend ungefähr $< 100 \text{ cP}$) ist. Fig. 11 zeigt ein Kontrollexperiment zur Demonstration der Reproduzierbarkeit der

erfindungsgemäßen Trenneinrichtung. Es wurden 96 identische DNA-Proben gleichzeitig getrennt. Es sind beispielhaft die Detektorsignale von acht Kapillaren über eine Detektionszeit von rd. 30 Minuten akkumuliert gezeigt. Es zeigt sich eine hervorragende Übereinstimmung der Trennergebnisse in den verschiedenen Kapillaren.

Die Erfindung wird oben unter Bezug auf Fluoreszenzmessungen erläutert. Es sind jedoch in analoger Weise auch optische Detektionen realisierbar, die auf Absorptions-, Reflexions- oder Transmissionsmessungen beruhen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Elektrophoreseeinrichtung mit einer Vielzahl von Trennkapillaren (10), die jeweils einen Detektionsbereich (10a) aufweisen, und einer Detektoreinrichtung (40) mit einer Abbildungseinrichtung (41) und einer Detektorkamera (42), wobei die Trennkapillaren so an einer gemeinsamen Halterungseinrichtung (50) angebracht sind, daß die Detektionsbereiche (10a) eine gerade Reihe (13) bilden, die mit der Abbildungseinrichtung auf die Detektorkamera abgebildet wird.
2. Elektrophoreseeinrichtung gemäß Anspruch 1, bei der eine Beleuchtungseinrichtung (60) zur gleichmäßigen, simultanen Beleuchtung der Reihe der Detektionsbereiche vorgesehen ist.
3. Elektrophoreseeinrichtung gemäß Anspruch 2, bei der die Beleuchtungseinrichtung eine Lichtquelle (61) und eine Optik (62) umfaßt, die ein strichförmiges Beleuchtungsfeld bildet.
4. Elektrophoreseeinrichtung gemäß Anspruch 3, bei der die Optik (62) eine Powell-Linse ist.
5. Elektrophoreseeinrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Detektorkamera (42) mindestens eine Reihe von Detektorelementen umfaßt, auf die die Reihe (13) der Detektionsbereiche abgebildet ist.
6. Elektrophoreseeinrichtung gemäß Anspruch 5, bei der die Detektoreinrichtung ein Dispersionselement (43) enthält und die Detektorkamera (42) eine zweidimensionale Detektormatrix umfaßt, auf die die Reihe der Detektionsbereiche in einer

ersten Richtung orts aufgelöst und in einer zweiten Richtung spektral aufgelöst abgebildet wird.

7. Elektrophoreseeinrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Halterungseinrichtung (50) ein Kapillarhalter (51) ist, der Führungsnuten (52) zur Aufnahme von Trennkapillaren mit gegenseitiger optischer Isolation aufweist.

8. Elektrophoreseeinrichtung gemäß Anspruch 7, bei der die Führungsnuten durch Stege (53) auf einer Oberfläche des Kapillarhalters gebildet werden, deren Abstände im wesentlichen gleich dem Außendurchmesser der Trennkapillaren ist.

9. Elektrophoreseeinrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Sammeleinrichtung (70) einen Vorrat des Trennmediums zur Beschickung der Trennkapillaren unter Wirkung eines Beschickungsdruckes enthält.

10. Elektrophoreseeinrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Sammeleinrichtung eine Molekülfalle (76) enthält.

11. Elektrophoreseeinrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Einlassenden der Trennkapillaren (10) eine gegenseitige Ausrichtung wie Proben auf einem Probenreservoir (21) besitzen.

12. Elektrophoreseeinrichtung gemäß Anspruch 10, bei der das Probenreservoir eine Mikrotiterplatte ist.

13. Elektrophoreseeinrichtung gemäß Anspruch 12, bei der die Mikrotiterplatte (21) 96,384 oder 1536 Vertiefungen zur Aufnahme von Proben enthält.

14. Elektrophoreseeinrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Viskosität des Trennmediums geringer als oder gleich 100 cP ist.

15. Elektrophoreseeinrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der eine automatische Probenzuführung vorgesehen ist.

16. Elektrophoreseeinrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Detektoreinrichtung (40) dazu vorgesehen ist, mindestens 96 Detektionsbereiche (10a) simultan orts- und spektralaufgelöst zu erfassen.

17. Verfahren zur kapillarelektrophoretischen Probentrennung, bei dem eine Vielzahl von Trennkapillaren gleichzeitig von den Auslaufenden her mit einem Trennmedium und anschließend von den Einlaufenden her mit zu trennenden Proben beschickt werden und anschließend ein Trennvorgang derart erfolgt, daß der Vorbeitritt der zu trennenden Proben an einer Vielzahl von Detektionsbereichen gleichzeitig zeit-, orts- und spektralaufgelöst detektiert wird.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, bei dem die Detektion mit einer zweidimensionalen Detektorkamera mit matrixartig angeordneten Detektorelementen erfolgt, wobei die Detektorelemente gruppenweise entsprechend vorbestimmten, interessierenden Spektralbereichen ausgelesen werden.

19. Verfahren gemäß Anspruch 18, bei der die auszulesenden Detektorelemente unter Verwendung eines Chain-Code-Algorithmus ermittelt werden.

20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19, bei dem die einzelnen Schritte vollautomatisch gesteuert ablaufen.

26

21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, bei dem die zu trennenden Proben in Probenreservoirren angeordnet sind und mit diesen zu den Einlaßenden der Trennkapillaren zugeführt werden.

22. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21, bei dem der Trennvorgang und die Detektion ohne eine Bewegung von mechanischen Bauteilen oder Flüssigkeiten erfolgt.

23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 22, bei dem die kapillarelektrophoretische Probentrennung mit der Anordnung von Proben in Probenreservoirren, der Beschickung der Trennkapillaren mit den Proben, der elektrophoretischen Trennung und einem Ersetzen des Trennmediums für alle Proben in den Probenreservoirren und für alle Trennkapillaren simultan vollautomatisch durchgeführt wird.

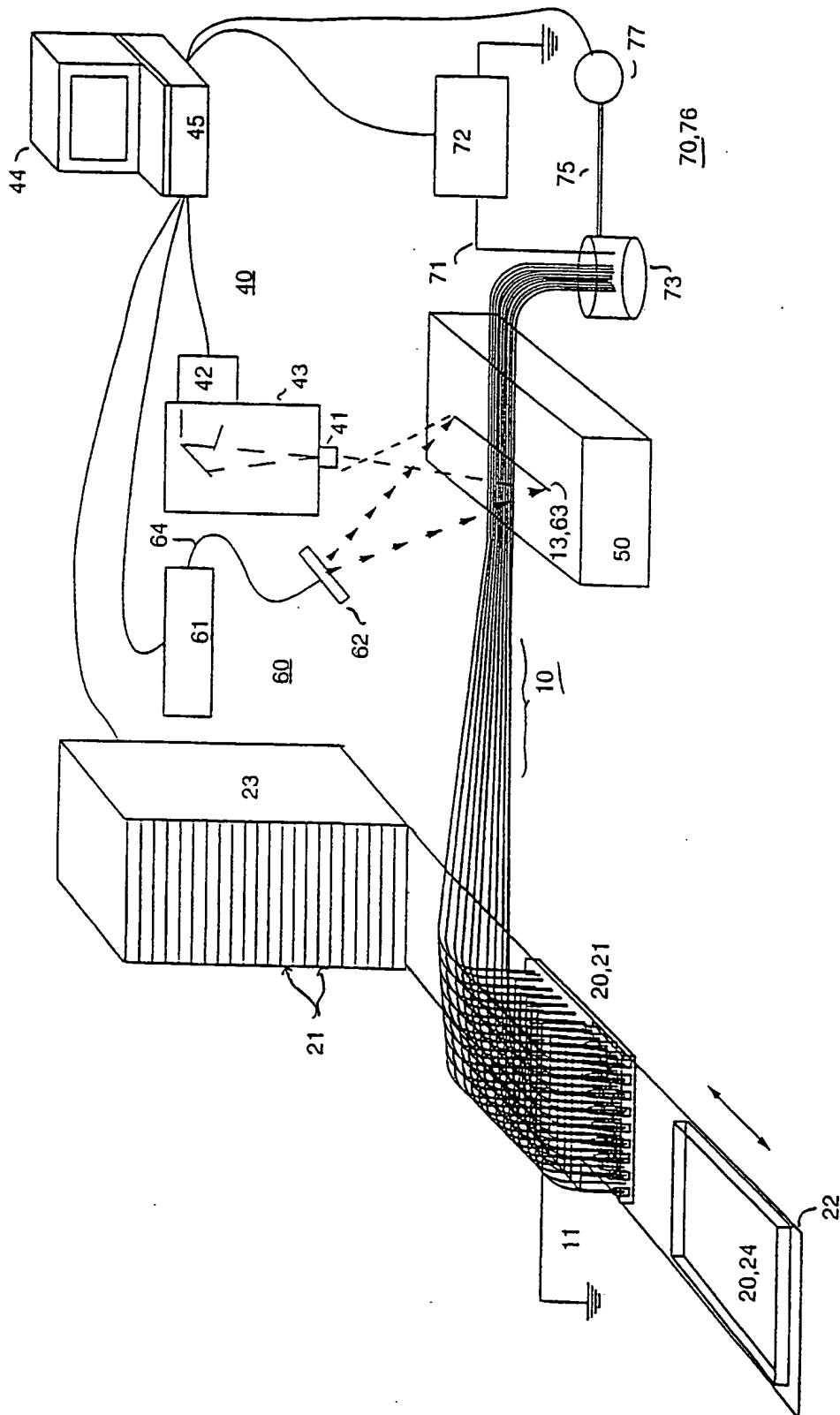


Fig. 1

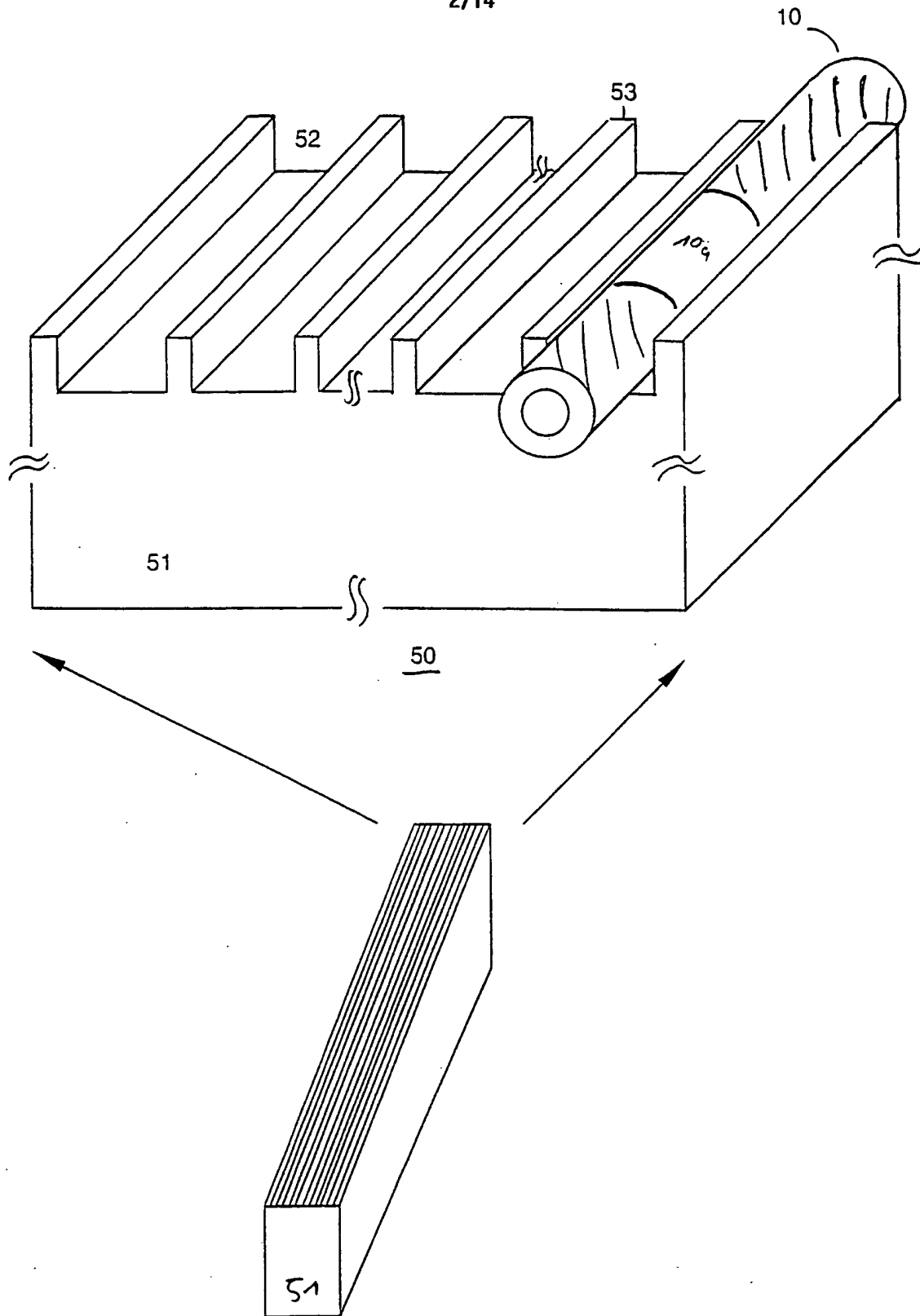


Fig. 2

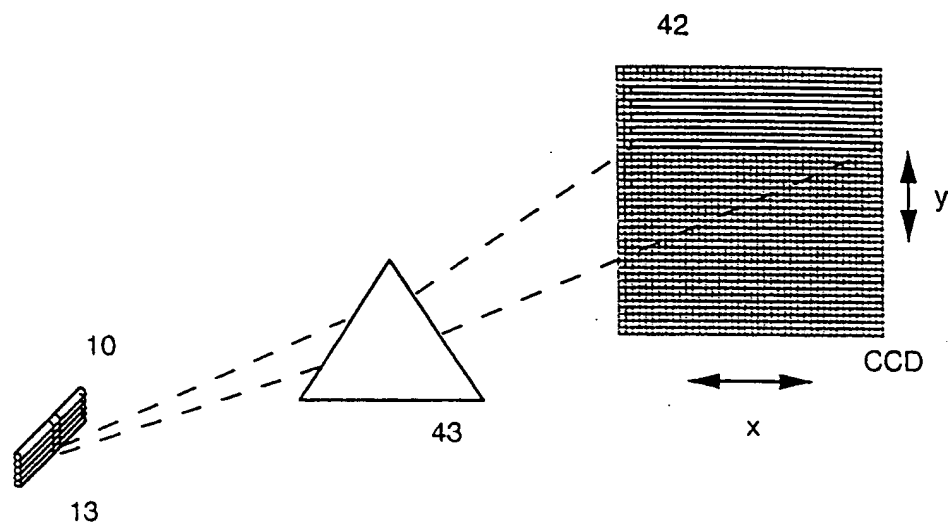
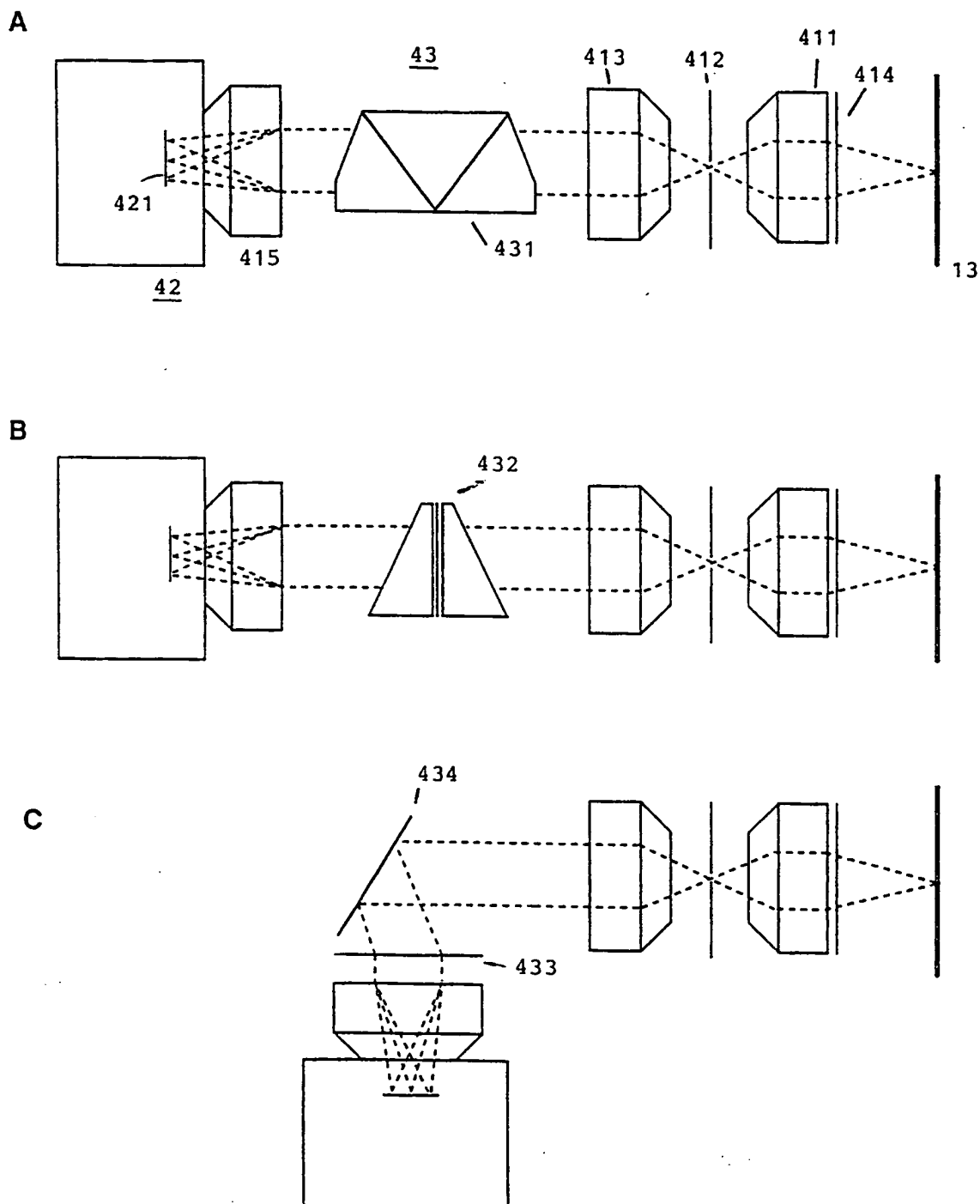


Fig. 3



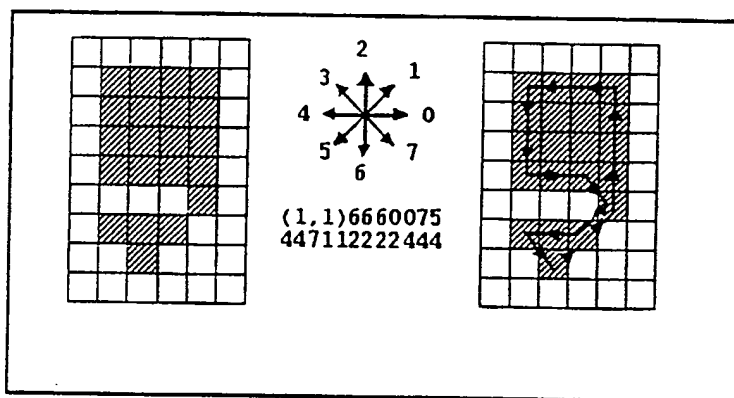


Fig. 5

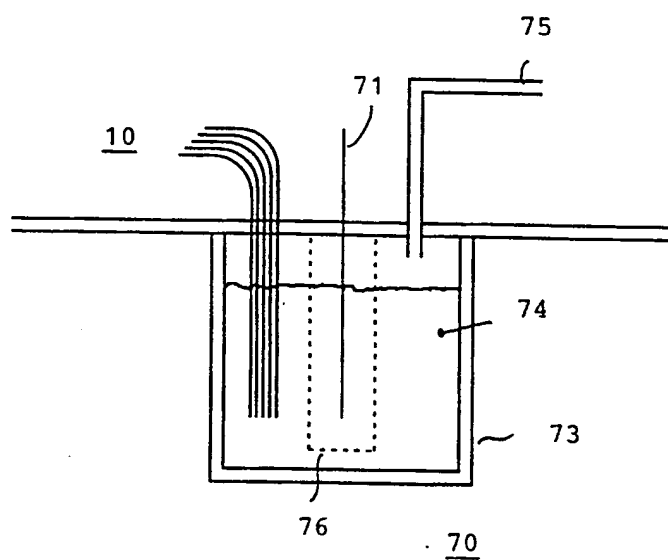


Fig. 6

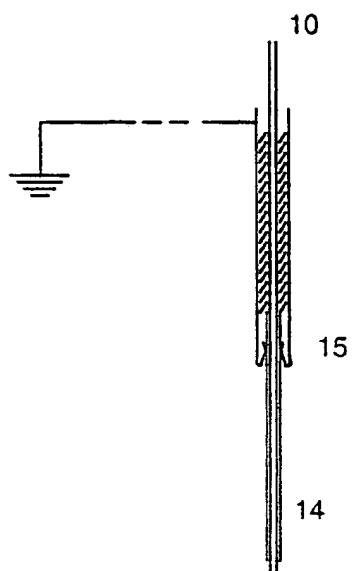


Fig.7

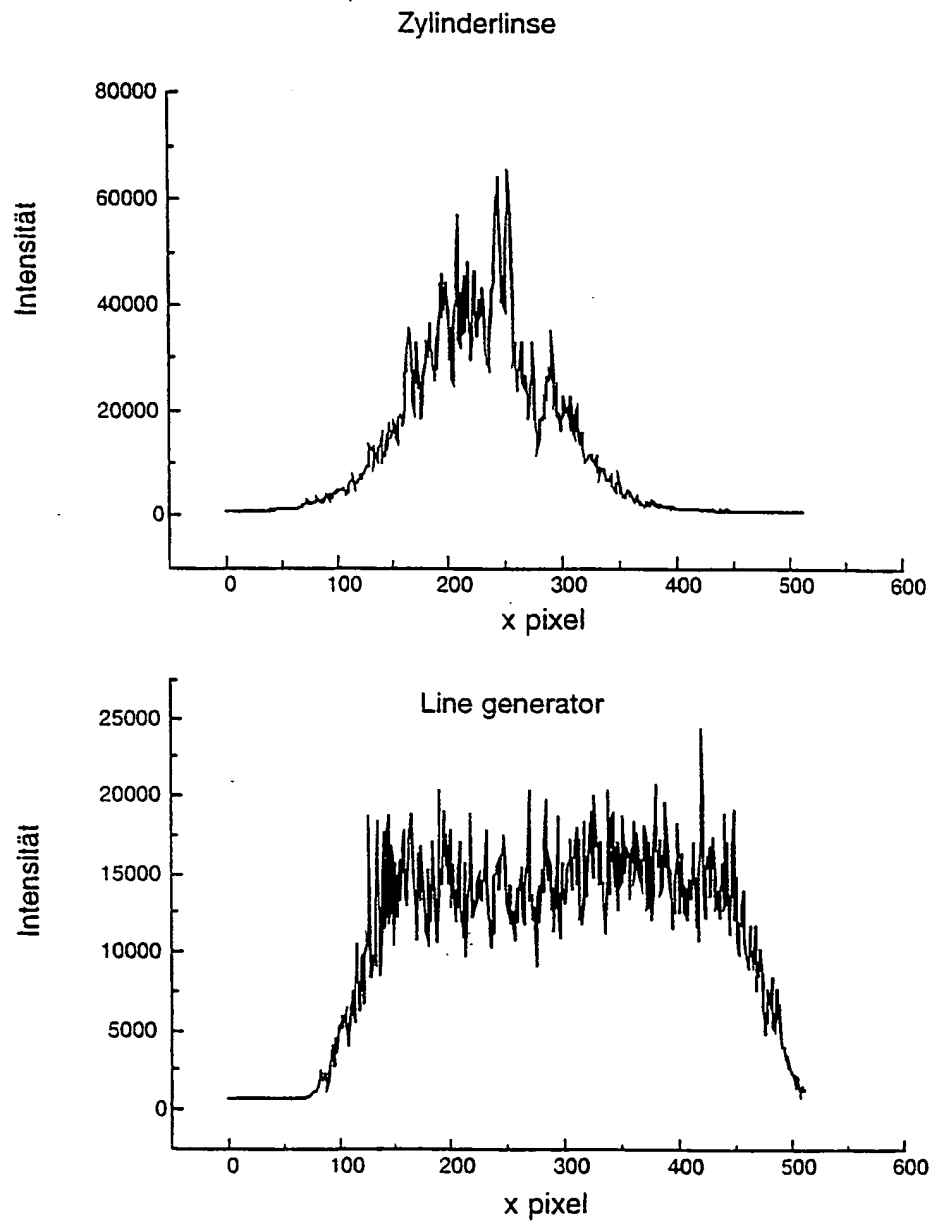


Fig. 8

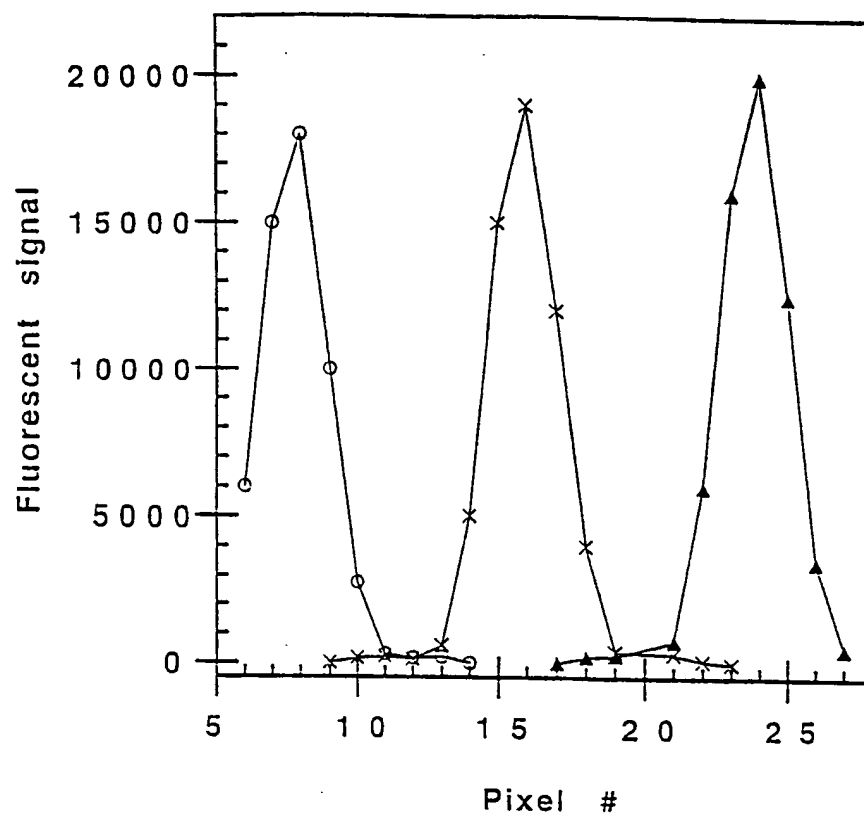
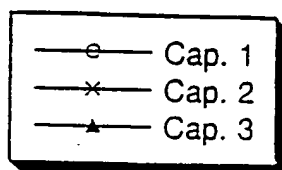


Fig. 9



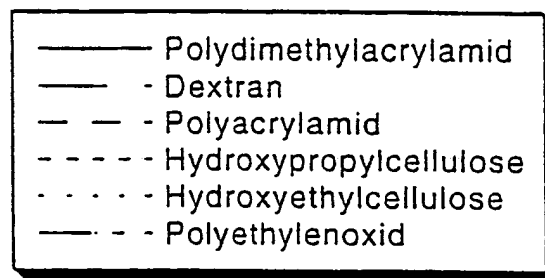
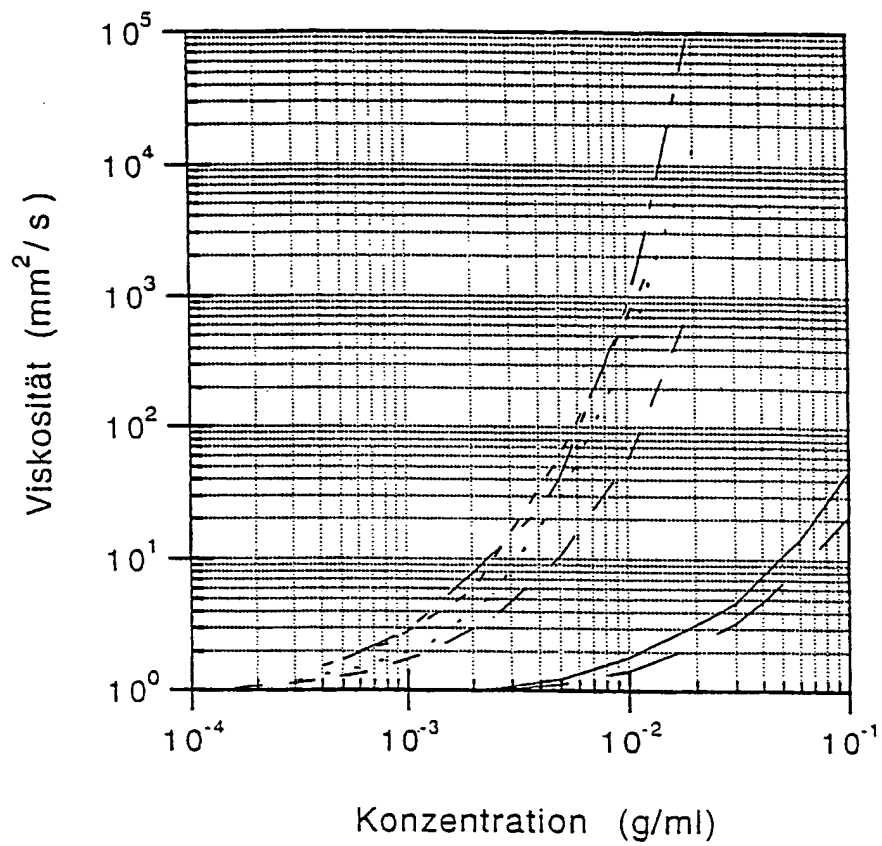


Fig. 10

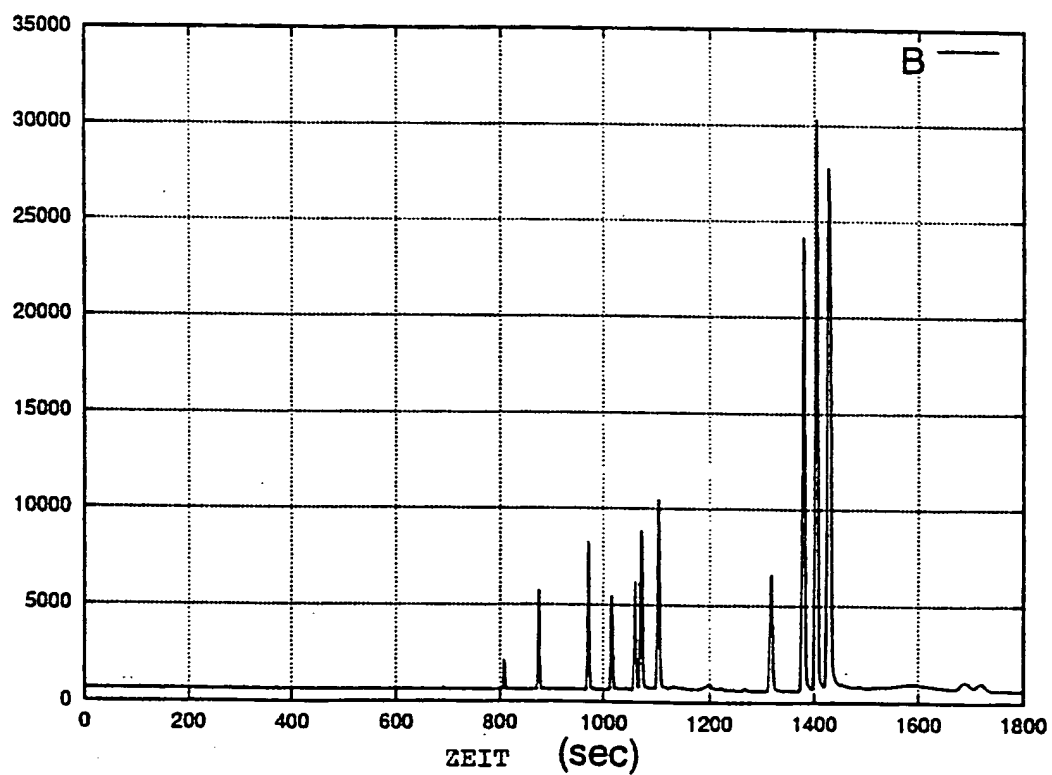
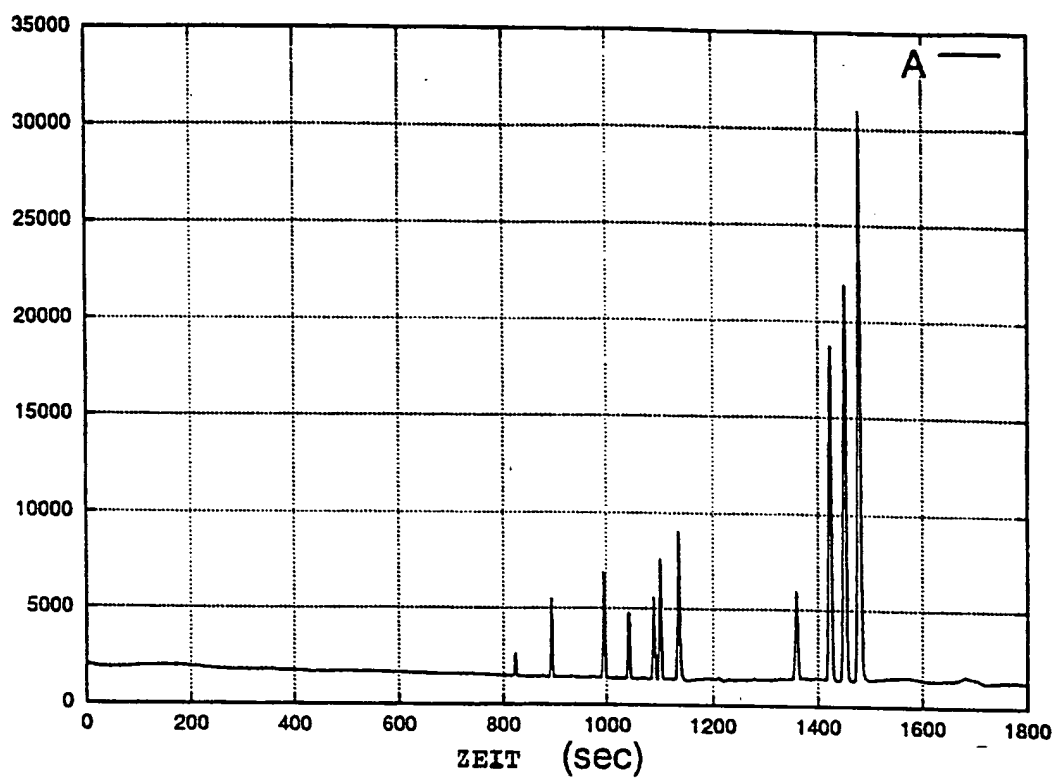


Fig. 11(1)

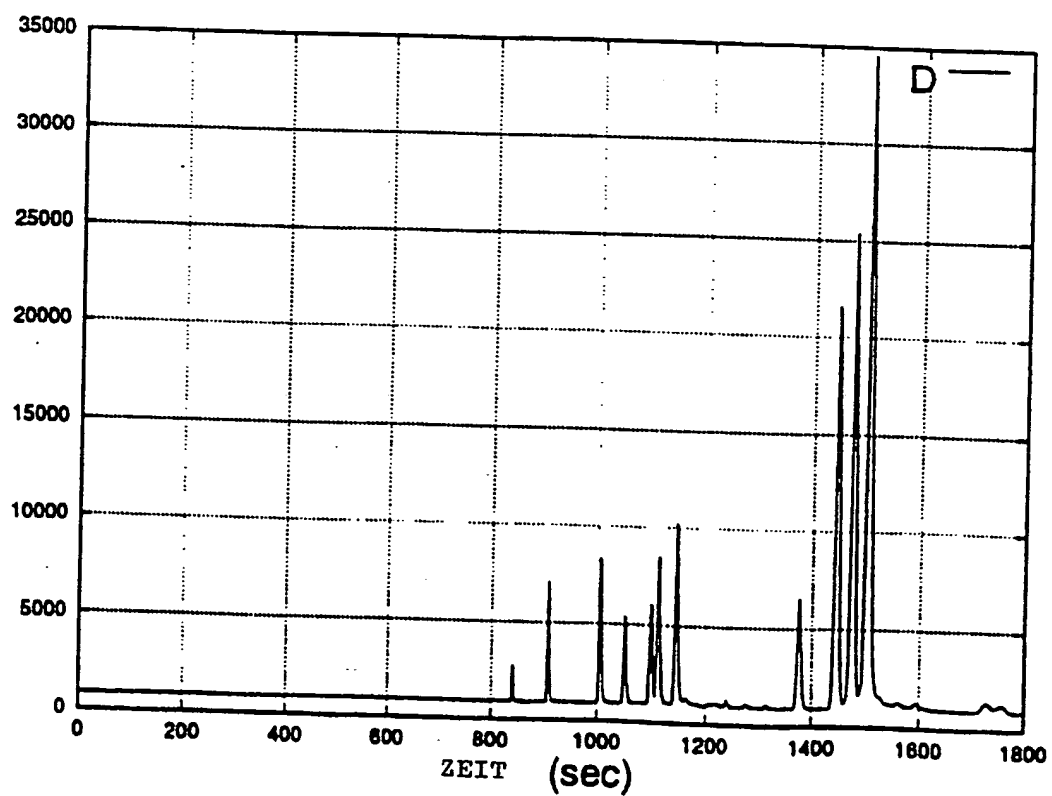
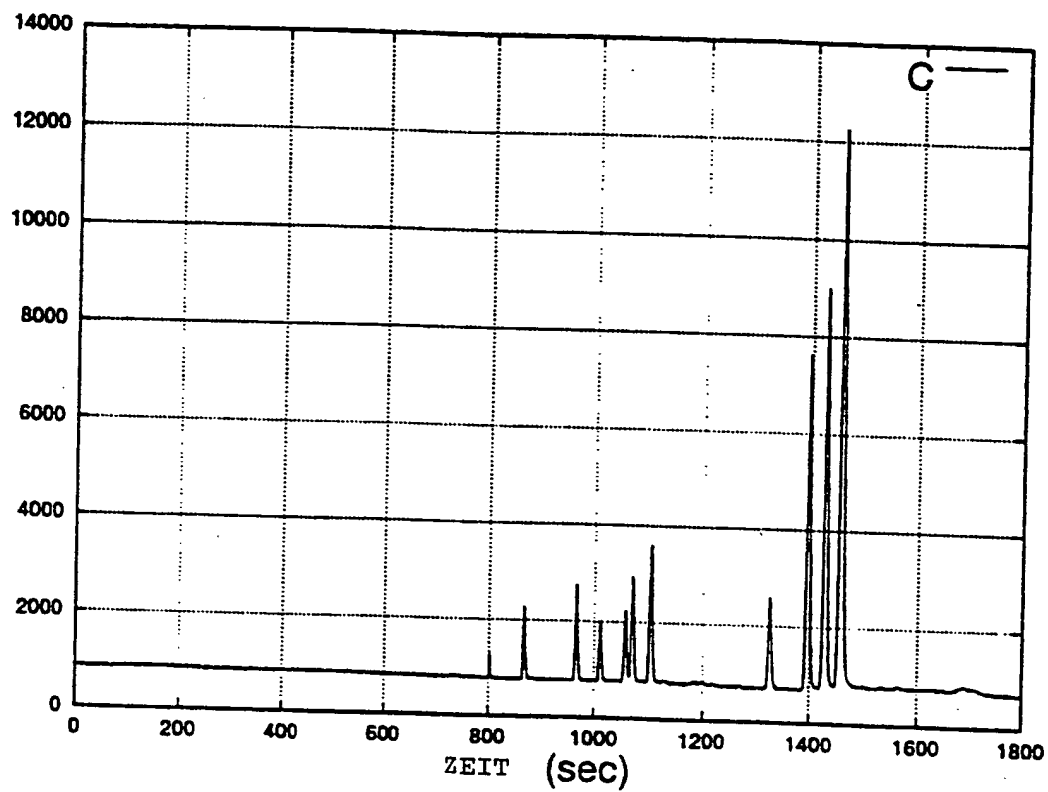


Fig. 11(2)

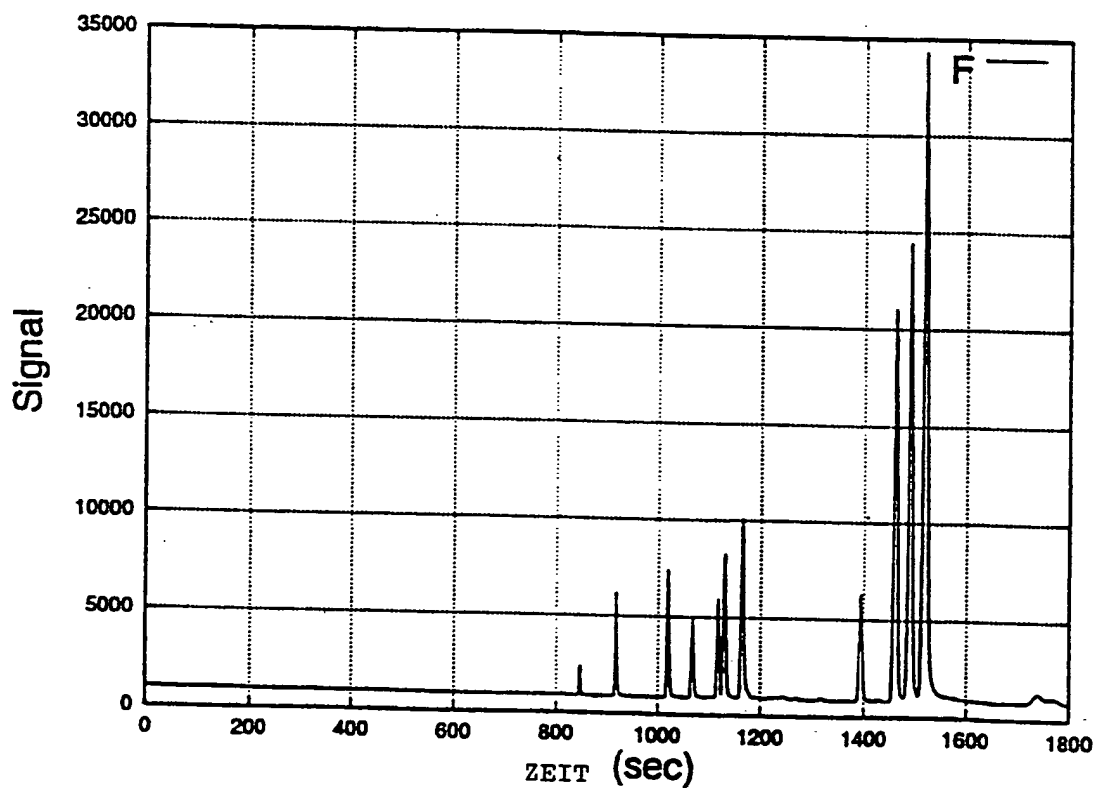
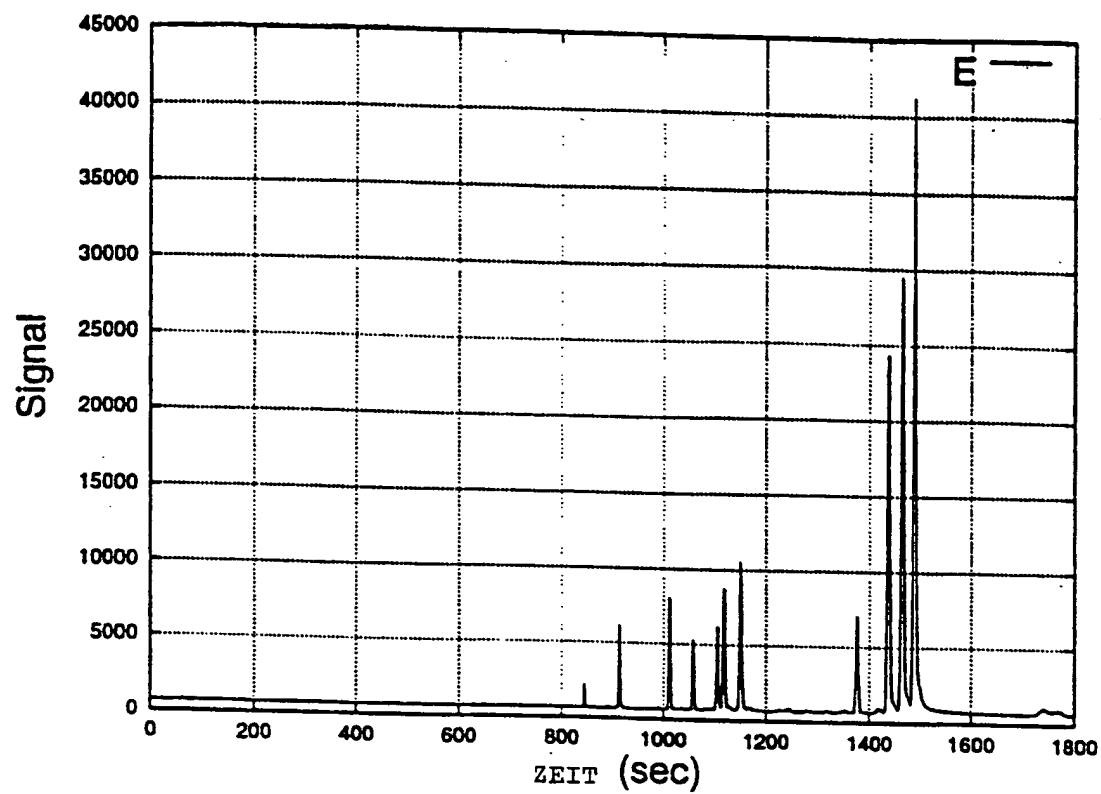


Fig. 11(3)

14/14

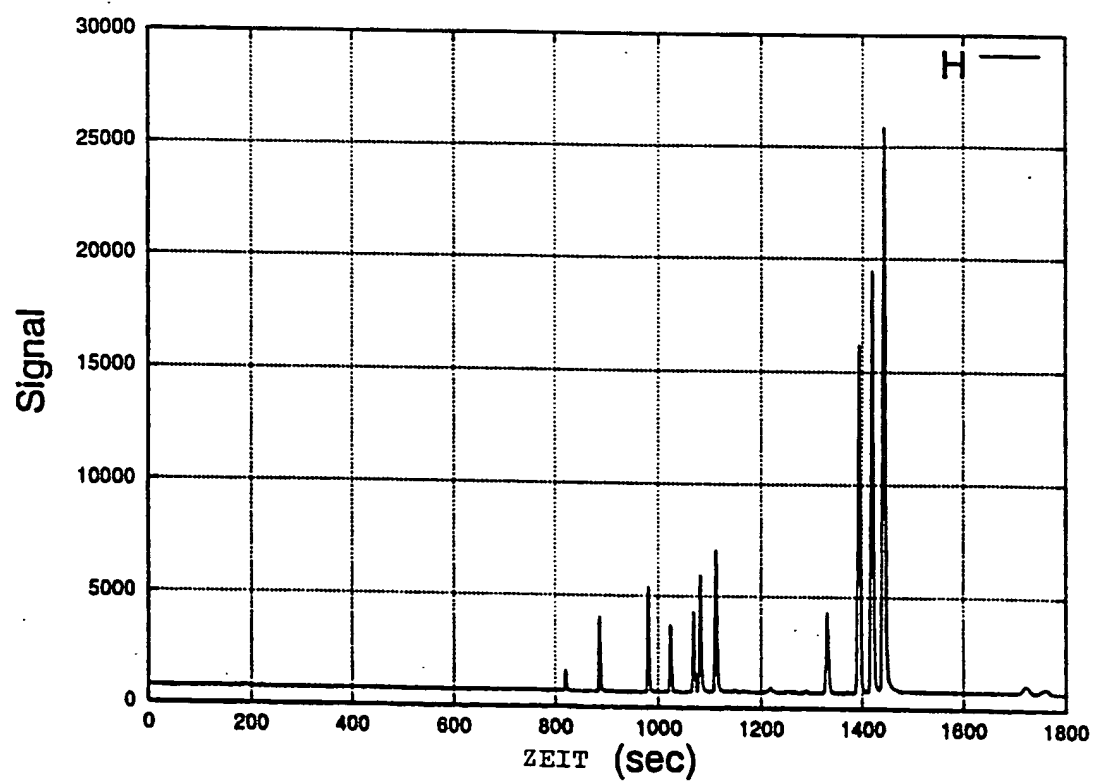
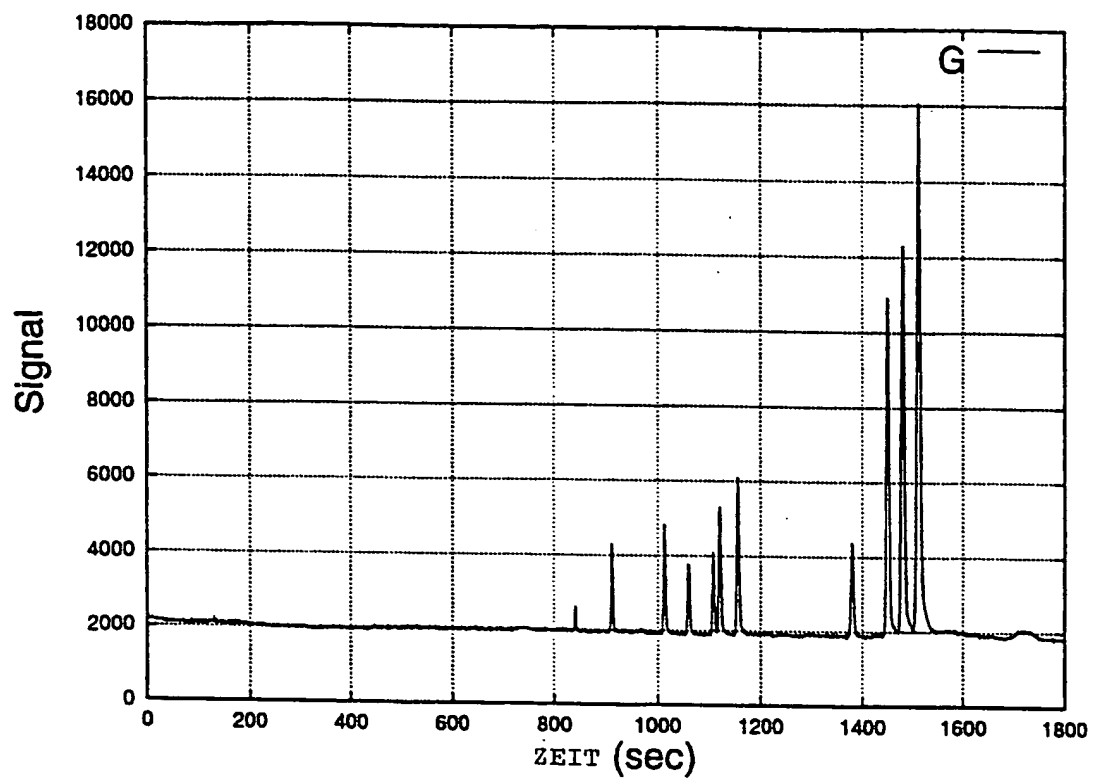


Fig. 11(4)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/00587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KYOJI UENO: "SIMULTANEOUS MONITORING OF DNA FRAGMENTS SEPARATED BY ELECTROPHORESIS IN A MULTIPLEXED ARRAY OF 100 CAPILLARIES" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 66, no. 9, 1994, pages 1424-1431, XP000446027 WASHINGTON, DC, US see figures 2,3	1,17
Y	TAKAHASHI S ET AL: "MULTIPLE SHEATH-FLOW GEL CAPILLARY-ARRAY ELECTROPHORESIS FOR MULTICOLOR FLUORESCENT DNA DETECTION" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 66, no. 7, 1 April 1994, pages 1021-1026, XP000442478 see figure 3	1,17
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 June 1999

Date of mailing of the international search report

17/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. Jonal Application No
PCT/EP 99/00587

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 584 982 A (ZHANG JIAN Z ET AL) 17 December 1996 cited in the application see the whole document -----	1
A	US 5 498 324 A (YEUNG EDWARD S ET AL) 12 March 1996 cited in the application see the whole document -----	1
A	US 5 567 294 A (DOVICH NORMAN J ET AL) 22 October 1996 cited in the application see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00587

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5584982 A	17-12-1996	US 5439578 A	08-08-1995
		US 5741412 A	21-04-1998
		AT 157452 T	15-09-1997
		AU 695154 B	06-08-1998
		AU 6922394 A	03-01-1995
		CA 2164207 A	22-12-1994
		WO 9429712 A	22-12-1994
		DE 69405233 D	02-10-1997
		DE 69405233 T	19-03-1998
		DK 701694 T	27-10-1997
		EP 0701694 A	20-03-1996
		ES 2106545 T	01-11-1997
		NZ 267045 A	24-10-1997
US 5498324 A	12-03-1996	US 5324401 A	28-06-1994
		WO 9418552 A	18-08-1994
US 5567294 A	22-10-1996	AU 1090297 A	22-08-1997
		CA 2245167 A	07-08-1997
		WO 9728443 A	07-08-1997
		EP 0877933 A	18-11-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00587

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KYOJI UENO: "SIMULTANEOUS MONITORING OF DNA FRAGMENTS SEPARATED BY ELECTROPHORESIS IN A MULTIPLEXED ARRAY OF 100 CAPILLARIES" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 66, Nr. 9, 1994, Seiten 1424-1431, XP000446027 WASHINGTON, DC, US siehe Abbildungen 2,3	1,17
Y	TAKAHASHI S ET AL: "MULTIPLE SHEATH-FLOW GEL CAPILLARY-ARRAY ELECTROPHORESIS FOR MULTICOLOR FLUORESCENT DNA DETECTION" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 66, Nr. 7, 1. April 1994, Seiten 1021-1026, XP000442478 siehe Abbildung 3	1,17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Juni 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Duchatellier, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. J. eines Aktenzeichens

PCT/EP 99/00587

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 584 982 A (ZHANG JIAN Z ET AL) 17. Dezember 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1
A	US 5 498 324 A (YEUNG EDWARD S ET AL) 12. März 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1
A	US 5 567 294 A (DOVICH NORMAN J ET AL) 22. Oktober 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00587

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5584982 A	17-12-1996	US 5439578 A	08-08-1995
		US 5741412 A	21-04-1998
		AT 157452 T	15-09-1997
		AU 695154 B	06-08-1998
		AU 6922394 A	03-01-1995
		CA 2164207 A	22-12-1994
		WO 9429712 A	22-12-1994
		DE 69405233 D	02-10-1997
		DE 69405233 T	19-03-1998
		DK 701694 T	27-10-1997
		EP 0701694 A	20-03-1996
		ES 2106545 T	01-11-1997
		NZ 267045 A	24-10-1997
US 5498324 A	12-03-1996	US 5324401 A	28-06-1994
		WO 9418552 A	18-08-1994
US 5567294 A	22-10-1996	AU 1090297 A	22-08-1997
		CA 2245167 A	07-08-1997
		WO 9728443 A	07-08-1997
		EP 0877933 A	18-11-1998